

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/87, 15/85, C07K 14/195, C12N 1/21, C12R 1/01, A01K 67/027, A61K 48/00</b>		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29884</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 17. Juni 1999 (17.06.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/08096 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. Dezember 1998 (11.12.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 54 938.1      11. Dezember 1997 (11.12.97)    DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> VON EICHEL-STREIBER, Christoph [DE/DE]; Bingerweg 15, D-55444 Schwenningen (DE). CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Seltersweg 85, D-35390 Giessen (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> KEIL & SCHAAFHAUSEN; Cronstetten Strasse 66, D-60322 Frankfurt am Main (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> TGC METHOD FOR INDUCTING TARGETED SOMATIC TRANSGENESIS  <b>(54) Bezeichnung:</b> TGC-VERFAHREN ZUR INDUKTION EINER ZIELGERICHTETEN, SOMATISCHEN TRANSGENITÄT  <b>(57) Abstract</b>  Disclosed is a TGC method for inducing targeted somatic transgenesis in an animal host, whereby bacteria with a foreign DNA integrated into an episomal vector release, under the control of eukaryotic regulatory elements for ulterior transcription and expression, said foreign DNA in the case of infection of a foreign organism, organ, tissue, cell line or individual cells, causing transcription and expression of foreign DNA and/or foreign protein in said location.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Es wird ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten somatischen Transgenität in einem animalen Wirt beschrieben, bei dem Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten und unter der Kontrolle eukaryotischer, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und Expression stehender Fremd-DNA bei der Infektion eines fremden Organismus, eines Organs, eines Gewebes einer Zelllinie oder einzelner Zellen die Fremd-DNA freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd-DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

5     **TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität**

10    Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität (TGC = targeted genetic conditioning), das zur Expression von Fremdproteinen in Zellen, einem Gewebe, einem Organ oder einem ganzen Wirtsorganismus sowie zur somatischen Gentherapie eingesetzt  
15    wird.

Es ist bekannt, daß Proteine für technische Anwendungen oder für therapeutische Zwecke durch den Transfer von Genen in Mikroorganismen oder Säugetierzellen in ausreichenden Mengen  
20    exprimiert werden können. Diese Verfahren sind besonders bedeutsam für körpereigene Proteine, die sonst nicht oder nur begrenzt zugänglich sind, wie Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren und humanisierte monoklonale Antikörper sowie für die Herstellung von Oberflächenproteinen  
25    pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur gefahrlosen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Durch "Protein-Engineering" können auch neuartige Proteine hergestellt werden, die durch Fusion, Mutation oder Deletion entsprechender DNA-Sequenzen anwendungs-optimierte  
30    Eigenschaften erhalten, zum Beispiel Immuntoxine.

Aus menschlichen Zellen gewonnene Gene sind auch in Maus-, Ratten- oder Schafzellen funktionsfähig und führen dort zur Bildung entsprechender Genprodukte. Dies wurde bereits  
35    praktisch bei der Herstellung von therapeutischen Proteinen,

- 2 -

zum Beispiel in der Milch transgener Nutztiere, angewendet. Der bisher bekannte Weg hierfür ist die Mikroinjektion entsprechender Fremd-DNA-tragender Vektoren in den Kern der befruchteten Eizelle, in der bei einer Ausbeute von 1% die DNA  
5 dann in das Chromosom eingebaut wird. Die transgene befruchtete Eizelle wird anschließend hormonell stimulierten Muttertieren reimplantiert. Ein Nachkomme, der das eingeschleuste Gen in allen Körperzellen trägt, ist die Grundlage für die Bildung einer "transgenen Herde". Durch die Nutzung  
10 der Gentechnik ist es möglich geworden, landwirtschaftliche Nutztiere so gezielt zu verändern, daß sie menschliche Proteine in ihrem Blut, ihrem Gewebe oder der Milch produzieren, die in Mikroorganismen oder Pflanzen nicht hergestellt werden können.

15 Der Einsatz von transgenen Tieren als Proteinproduktionsfabriken hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß hierzu ein Eingriff in die Keimbahn der Tiere erforderlich ist. Wegen des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes zur Schaffung und Züchtung von transgenen Tieren und auch wegen der  
20 Diskussion über die ethischen Konsequenzen dieser Methoden sind alternative Methoden zur Proteinproduktion in einem animalen Wirt ohne Keimbahneingriff erforderlich und wären von sehr großem Vorteil.

25 Es ist weiterhin bekannt, daß die Milch von Säugetieren wie Kühen, Schafen, Ziegen, Pferden oder Schweinen eine Reihe von bakteriellen Krankheitserregern enthalten kann. Darunter sind Listerien, Mykobakterien, Brucellen, Rhodococcus, Salmonellen,  
30 Shigellen, Escherichia, Aeromonaden und Yersinien, oder generell Bakterien mit intrazellulärem Lebensstil [1, 2]. Diese Bakterien werden im wesentlichen durch orale Aufnahme auf den Menschen oder das Tier übertragen [3], aber auch Tröpfcheninfektionen spielen eine Rolle. Eine Hauptquelle für  
35 die Infektion des Menschen mit Listerien [4], Mykobakterien

- 3 -

[5] und *Escherichia coli* ist kontaminierte Milch [6]. Der Mensch nimmt die Bakterien beim Verzehr nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukte auf. Die anderen oben aufgeführten Bakteriengattungen wie Salmonellen, Shigellen, Yersinien, Rhodococcus und Brucellen werden in ähnlicher Weise auf den Menschen übertragen. Bakterien können aber auch durch andere mit Bakterien infizierte Tierprodukte aus der Kuh, der Ziege, dem Schaf, dem Hasen, dem Pferd, dem Schwein oder dem Geflügel in den Menschen gelangen.

10

Die Infektion der Tiere erfolgt dabei oft über mukosale Oberflächen, sehr häufig über den Verdauungstrakt. Nach der Aufnahme von Bakterien werden zum Beispiel im Fall von Listerien jedoch nicht alle Gewebe symptomatisch infiziert.

15

Bei der Kuh und bei der Ziege steht die Infektion von Euter, Milz und Leber im Vordergrund des Infektionsgeschehens. Bei Schafen kann es außerdem auch zur Erkrankung des zentralen Nervensystems in Form der Meningitis kommen, so daß nicht alle Tiere die Infektion überleben. Mit der Infektion des Euters ist die Infektionskette geschlossen. Mit kontaminierter Milch aufgenommene Bakterien können dann das Tier, zum Beispiel das saugende Kalb, oder den Menschen über den Verdauungstrakt neu infizieren.

20

Über den Weg der bakteriellen Infektion des Menschen, hier speziell dargestellt am Beispiel der Listerien, ist derzeit folgendes bekannt:

25

Für den Menschen sind von den sechs bekannten *Listeria*-Spezies lediglich *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* [7] pathogen. Die Erkrankung des Menschen erfolgt beim Verzehr infizierter Milch oder Milchprodukte. Der Verlauf der Infektion hängt vom Gesundheitszustand des Menschen ab und ist in aller Regel undramatisch. In der Schwangerschaft kann es zu der intrauterinen Übertragung des Keims auf den Fetus kommen,

30

35

- 4 -

verbunden mit Fehl-, Tod- oder Frühgeburten. In allen Fällen besteht eine exzellente und problemlose Behandelbarkeit mit Antibiotika wie Ampicillin oder Erythromycin [8; 8a].

5 Für *L.monocytogenes* in Mensch und Tier, für *L.ivanovii* im Schaf, ist der Weg in die Zelle gut definiert. Zur vollen Pathogenität der Listerien sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren notwendig. Dazu gehört PrfA (positive regulator of virulence), ActA (actin nucleating protein), PlcA (phosphatidylinositol-specific phospholipase), PlcB (phosphatidylcholine-specific phospholipase), Hly (listeriolysin), Mpl (metalloprotease) [9]. Die Zellspezifität der Pathogen-Wirtszelle-Interaktion wird über eine Reihe von Proteinen vermittelt. Dazu gehören die Internaline InlA und InlB, die  
10 am initialen Kontakt und der Interaktion von Bakterien und Zelloberfläche beteiligt sind [10, 11]. *L.monocytogenes* kann in der experimentellen Situation unter anderem Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten infizieren. Darüber hinaus infiziert *L.monocytogenes* mit neutrophilen  
15 Granulocyten, Makrophagen und Lymphozyten auch Zellen des weißen Blutbildes. Dies ist ein wesentlicher Faktor bei der Übertragung der Bakterien von der Eintrittspforte zum Zielorgan im Wirt. Schließlich kann auch das Lungengewebe durch Listerien infiziert werden, wenn man die Bakterien über  
20 Tröpfcheninfektion appliziert.

Nach der Adhäsion an der Zelloberfläche wird *L.monocytogenes* durch Endozytose in die Zelle eingeschleust, zerstört unter der Einwirkung von Listeriolysin (Hly) die Endosomenmembran und wird so in das Zellzytosol freigesetzt [14]. In der Zelle angekommen, kann sich der Keim vermehren. Unter der Produktion weiterer Proteine bleibt das vollpathogene Bakterium nicht  
30 ortsständig, sondern bewegt sich aktiv fort. Die Fortbewegung wird durch die Ausnutzung einer Reihe von *L.monocytogenes* eigenen und einiger zelleigener Proteine bewerkstelligt [15,

- 5 -

16]. ActA wird auf der Zelloberfläche der *L.monocytogenes* exprimiert. Es bindet das zelluläre Protein VASP, das seinerseits die Brücke zur Anheftung von zellulären Aktin bildet. Im weiteren Verlauf bilden sich Aktinschweife aus, die  
5 das Bakterium an seiner Spitze tragen und es so durch die Zelle weiterbewegen. Trifft *L.monocytogenes* auf die Zellmembran, so entsteht eine Membranprotrusion, die bei benachbarten Zellen direkt in die Nachbarzelle hineinragt. Diese Ausstülpung wird dann von der Nachbarzelle endozytiert, so daß  
10 *L.monocytogenes* sich in der neuen Zelle innerhalb einer zweifachen Membran befindet. Die beiden Membranen werden unter Einwirkung von Hly und PlcB aufgelöst [17]. Am Ende dieses Vorganges hat *L.monocytogenes* auch die Nachbarzelle infiziert und der Infektionsprozeß beginnt von Neuem. So gelangt  
15 *L.monocytogenes* unter anderem in die sekretorischen Zellen des Euters wie der Kuh. Sekretierte Listerienproteine werden in der Milch nachweisbar, d.h. sie werden intrazellulär aus der laktierenden Zelle in die Milch abgegeben [18]. Zu diesen Proteinen zählen mit Hly (Listeriolysin) und IrpA (internalin  
20 related protein [19]) zwei Pathogenitätsfaktoren, die von *L.monocytogenes* im Wirt in großen Mengen produziert, sezerniert und in die Milch ausgeschieden werden [20].

Diese Kenntnisse des Infektionsprozesses haben es ermöglicht,  
25 *L.monocytogenes* genetisch so zu verändern, daß er fremde Proteine exprimiert. Beispiele für die Expression fremder Proteine in *L.monocytogenes* sind: Alkalische Phosphatase aus *Escherichia coli*, das Nucleoprotein aus dem Lymphochoriomeningitis virus (LCMV), das Nucleoprotein aus dem Influenza virus,  
30 das "major capsid protein" (L1) aus cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) und das Gag Protein aus HIV Typ 1 [20 bis 27].

Neben Proteinen prokaryonten Ursprungs handelt es sich hierbei  
35 um virale Proteine, die normalerweise nicht innerhalb der

- 6 -

eukaryonten Zelle produziert werden. Solche und ähnliche Fremdproteine prokaryonten und eukaryonten Ursprungs können von *L.monocytogenes* produziert werden, ohne daß eine eukaryonte Zelle dazu notwendig ist. Von *L.monocytogenes* produzierten Proteine werden in der Milch ausgeschieden.

Die Infektion durch Bakterien erfolgt durch spezifische Interaktionen von Liganden-Proteinen der Bakterien mit Rezeptor-Proteinen der Zielzellen. Hieran ist im Falle von *L.monocytogenes* die Internalinfamilie maßgeblich beteiligt; sie bestimmt im wesentlichen die Zellspezifität des Infektionsprozesses [28]. Zudem wird eine ActA abhängige Zellaufnahme diskutiert, die über Rezeptoren der Heparansulfatfamilie vermittelt wird [29]. Infiziert *L.monocytogenes* die Zelle, so kommt es nicht in jedem Fall zu einem vollen Infektionszyklus. Wird in *L.monocytogenes* Listeriolysin ausgeschaltet, so bleiben die Bakterien im Endosom stecken und die Infektion der "ersten Zelle" kommt nicht zu Stande. Bakterien, in denen das Protein ActA ausgeschaltet, inaktiv oder nicht mehr vorhanden ist, kommen in die erstinfizierten Zellen, bleiben aber dort stecken und können die Nachbarzellen nicht mehr infizieren [30, 31]. Bei der Ausschaltung der PclB ist der Keim nicht mehr in der Lage, sich in einer zweiten Zelle zu etablieren.

*L.monocytogenes* ist ein Bakterium, das durch eine Reihe von Antibiotika behandelt werden kann. Besonders geeignet sind Ampicillin und Penicillin (jeweils in Kombination mit Gentamycin). Als Alternative werden auch Erythromycin und Sulfonamide eingesetzt. In besonderen Fällen kommen Tetracykline, Vancomycin oder Chloramphenicol zum Einsatz [32]. Entsprechende Behandlungsmöglichkeiten bestehen auch für andere Bakterien [8a] der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder andere Bakterien, die mit dem genannten Bakterien genetisch oder biochemisch verwandt sind.



- 7 -

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellte sich nun die Aufgabe, eine bakterielle Infektion für ein Verfahren zur organotropen Proteinproduktion zu nutzen.

- 5    Gelöst wird diese Aufgabe durch das ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, bei dem Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, welche in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen,  
10 Geweben, einem Organ oder dem ganzen Wirtsorganismus ihre genetischen Informationen in die infizierte Einzelzelle freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein bewirken.

- Dieses Verfahren kann entweder zur Gewinnung eines Fremd-  
15 proteins eingesetzt werden, dient aber vorteilhaft auch zur somatischen Gentherapie, bei der die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden Proteins veranlaßt oder durch die Erzeugung von einzel- oder doppel-  
20 strängiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert. Dieses Verfahren kann auf alle bekannten Nutztiere und auch auf den Menschen angewendet werden.

- 25    Handelt es sich bei dem infizierten Gewebe um das Ei eines Geflügeltieres, so wird das Fremdprotein im Ei produziert und kann aus diesem durch die bekannten Verfahren der Isolierung von Proteinen, zum Beispiel aus Eiern, isoliert werden. Handelt es bei den infizierten Zellen um Zellen des Blutes,  
30 so kann durch parenterale Infektion der Zellen eine Verbreitung der Bakterien und mit ihnen der Fremd-DNA im injizierten Gesamtorganismus erzielt werden. Handelt es sich bei den Wirtstieren um Versuchstiere, deren infiziertes Organ ein Euter ist, so wird in der Milch des Versuchstieres das

- 8 -

gewünschte Fremdprotein produziert, aus der das Fremd-Protein dann isoliert werden kann.

Das TGC-Verfahren wird im folgenden exemplarisch für das  
5 Bakterium *L.monocytogenes* besprochen. Es kann entsprechend  
aber auch bei allen intrazellulär wachsenden Bakterien  
angewendet werden, unter denen die Bakterien der Gattungen  
*Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*,  
*Enterobacteriaceae* (bei letzterer insbesondere Bakterien der  
10 Spezies *Yersinia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*),  
*Legionella*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder  
Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten  
Gattungen hervorzuheben sind, obwohl auch andere Bakterien-  
Gattungen, die nicht pathogen sind und auch keinen intrazel-  
15 ulären Lebensstil haben, für das erfindungsgemäße Verfahren  
geeignet sind, sofern sie in einem eukaryonten Wirtsorganismus  
lebensfähig sind.

Es ist außerdem möglich, das TGC-Verfahren mit von Hause aus  
20 apathogenen Bakterien durchzuführen, die durch genetische  
Manipulationen mit zusätzlichen Faktoren ausgestattet werden,  
die ihnen den Zutritt zur Zelle ermöglichen. Zu einer  
derartigen "Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren" können viele  
von Hause aus nicht intrazellulär wachsende Bakterien  
25 herangezogen werden, wie *Bacillus subtilis*, *Lactobacillen*,  
*Pseudomonaden*, *Staphylokokken*. Ein in diesem Sinn aufgerüste-  
ter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*,  
der zusätzlich mit dem *Listeriolysin* aus *L.monocytogenes*  
ausgerüstet ist. Ein Beispiel für die Aufrüstung von apathoge-  
30 nen Bakterien zum TGC-Sicherheitsstamm wird mit der Aus-  
stattung von *L.innocua* mit dem *hly* und/oder dem *actA* Gen aus  
*L.monocytogenes* im Beispiel 1 angegeben. Ein weiteres Beispiel  
ist *E.coli* K12 aufgerüstet mit dem *Invasin* (*inv*) aus  
*Yersinia pseudotuberculosis*.

35

- 9 -

Das TGC-Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

a) Klonierung der TGC-(Fremd)-DNA:

5 Das TGC-Verfahren wird durch die Vorbereitung des *L.monocyto-*  
genes Stammes im Labor eingeleitet. In einen geeigneten Vektor  
wird die cDNA für das herzustellende Fremdprotein insertiert.  
Die Einfügung der cDNA wird dabei in bekannter Weise so  
vorgenommen, daß die spätere Transkription und Expression im  
10 eukaryontischen Wirt sichergestellt ist. Soll das Protein von  
der Zelle sekretiert werden, so müssen die Vektoren passende,  
wirtszellspezifische Signalsequenzen enthalten. Beim Vektor  
kann es sich um einen eukaryonten Vektor handeln, zum Beispiel  
um pCMV der Firma Clontech oder um pCMD der Firma Invitrogen,  
15 beide käuflich zu erwerben. Als wesentliche Kriterien der  
Auswahlvektoren weisen diese eukaryonte Promotoren, Donor und  
Akzeptorstellen für das RNA-Splicing auf (fakultative  
Eigenschaft), sowie eine Polyadenylierungsstelle zum Beispiel  
aus SV40. Zur Vervielfältigung der DNA kann die Produktion der  
20 genetischen Konstrukte (im folgenden als TGC-DNA bezeichnet)  
in *E. coli* oder jedem anderem geeigneten Wirtstamm nach  
Methoden vorgenommen werden. Die TGC-DNA muß zur primären  
Klonierung lediglich in die ausgewählten Bakterien eingebracht  
und dann später in den ausgewählten bakteriellen TGC-Si-  
25 cherheitsstamm transferiert werden können. Der Transfer in  
*L.monocyto*genes kann mit den verschiedenen, wohlbekannten  
Methoden des Gentransfers von isolierter DNA (Transformation,  
Elektroporation etc.) oder durch die Vorgänge der Konjugation  
und der Transduktion direkt oder mittelbar von Bakterium zu  
30 Bakterium vorgenommen werden.

b) TGC-Sicherheitsstämme als Rezipienten der TGC-DNA:

Als Rezipient der TGC-DNA werden besondere *L.monocyto*genes  
35 Wirtsstämme - oder aber andere TGC-Ammen, die wie *L.monocyto*-

- 10 -

genes intrazellulär vitale Bakterien (z.B. Yersinien), oder ins Endosom-eindringende (z.B. Salmonellen) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren "aufgerüstete", ansonsten nicht pathogene Bakterien (z.B. Escherichia coli oder L. innocua) darstellen - eingesetzt, die folgende Eigenschaften, einzeln oder in Kombination, erfüllen:

- (A.1) sie eignen sich als Empfänger fremder DNA (genetische Manipulierbarkeit);
- (B.1) sie tragen Mutationen, die Gene betreffen, ohne die ein Überleben der Bakterien in der Außenwelt, also außerhalb eines Wirtes, zum Beispiel bei niedrigerer Temperatur, unmöglich ist (sicherheitsrelevante Eigenschaft);
- (B.2) es sind attenuierte Wirtsstämme, bei denen ein Teil ihrer Pathogenitätsfaktoren deletiert oder inaktiviert ist, so daß sie nicht mehr die volle Pathogenität der Wildtypstämme entfalten (Attenuierung);
- (C.1) sie sind "genetische Krüppel", die durch gezielte, vom Experimentator eingeführte Stoffwechseldefekte nur auf definierten, artifiziellen Medien zur Anzucht gebracht werden können, aufgrund dieser Defekte aber in der Zelle und vor allem im Ganztier nicht mehr wachsen, sich also nicht vermehren können ("endogener Suizid");
- (C.2) sie induzieren ihre Aufnahme in Endosomen und werden in diesen Zellkompartimenten aufgelöst (Infektion über Endosomen)
- (C.3) sie werden von professionellen Phagozyten in Phagolysosomen aufgenommen, können diese Zellkom-

- 11 -

partimente jedoch auflösen (d.h. überwinden)  
(Infektion über Phagolysosomen)

5 (C.4) die Bakterien tragen Suizidgene, die erst nach dem  
Eindringen in die Wirtszelle konditional aktiviert  
werden, so daß die Bakterien sich selbst umbringen  
("exogener Suizid")

10 (D.1) sie sind durch Antibiotikabehandlung des späteren  
animalen Wirts zu eliminieren (Abtötung durch  
Antibiose).

15 Bei Punkt A.1 handelt es sich um eine allgemeine Eigenschaft  
der Bakterien, ohne die keine der angesprochenen genetischen  
Manipulationen möglich wäre.

20 Unter den Punkten B.1 und B.2 sind Veränderungen zusammenge-  
faßt, die die Anwendung der Bakterien sicherer machen.  
Bakterien mit diesen Veränderungen können sich bei Aus-  
scheidung in die Umwelt nicht mehr vermehren, bzw sind  
attenuiert (B.1), weisen ein geringeres pathogenes Potential  
auf (B.2). Die Veränderung von Bakterien gemäß Unterpunkt B.2  
hat auch Einfluß auf die Freisetzung der Fremd-DNA in die  
Zelle (siehe Unterpunkte C.2 + C.3).

25 Bei den Unterpunkten C.1 - C.4 handelt es sich um genetische  
Veränderungen von Bakterien, die die Freisetzung der Fremd-DNA  
in die animale Zelle maßgeblich bestimmen. Unter den Punkten  
C.3 - C.4 sind Infektionswege aufgezeigt, die für Bakterien,  
30 die weiter unten unter den Beispielen zusammengefaßt werden,  
als Weg der Übertragung der Fremd-DNA in das Zytosol der  
animalen Zelle identifiziert wurden.

35 Der unter (D.1) aufgeführte Eingriff erlaubt die gezielte  
Abtötung der Bakterien. Dadurch wird die Freisetzung der

- 12 -

Fremd-DNA aus den Bakterien bewirkt, die Therapie mit Antibiotika ist aber auch ein sicherheitsrelevanter Aspekt.

Über die Veränderungen und Eingriffe gemäß C.1 - C.4 und auch  
5 B.2 und D.1 wird die Freisetzung der rekombinanten DNA in die Zelle erst ermöglicht.

Stämme mit diesen Eigenschaften (einzeln oder in Kombination) werden als TGC-Sicherheitsstämme bezeichnet.

10

c) Optimierung der TGC-Amme auf das Zielorgan des TGC-Verfahrens:

Die TGC-DNA, die für das herzustellende Fremdprotein kodiert,  
15 wird in den TGC-Sicherheitsstamm durch Transformation, Konjugation oder Transduktion überführt. Die so erhaltenen Stämme werden nachfolgend als TGC-Amme bezeichnet. Die Amme versorgt (füttert) den TGC-Wirt mit der DNA und induziert damit die somatische Transgenität. Damit während des TGC-  
20 Verfahrens das gewünschte Fremdprotein optimal exprimiert wird, sollte sich das Gen vorteilhafterweise unter der Kontrolle von Promotoren und anderen regulatorisch wirkenden Sequenzen befinden, die aus dem vorher ausgewählten Zielorgan des TGC-Verfahrens stammen oder für das Zielorgan optimiert  
25 sind, zum Beispiel Euter-spezifische Promotoren und Sekretionssignale.

d) Infektion des Wirtsorganismus mit der TGC-Amme:

30 Durch die Anzucht der TGC-Amme wird sie in vitro in einem Kulturmedium vermehrt und für die Durchführung des TGC-Verfahrens in einem ausgewählten Wirtsorganismus vorbereitet. Alternativ kann die TGC-Amme auch im dem Wirtsorganismus (Mensch oder Tier, im folgenden TGC-Wirt genannt), durch in  
35 vivo Anzucht vermehrt. Als Vorbereitung für die Infektion wird

- 13 -

die TGC-Amme in einer an den TGC-Wirt adaptierten, nicht bakteriziden Lösung, einem Puffer oder einer anderen physiologischen Flüssigkeit aufgenommen. Die Flüssigkeit wird dem TGC-Wirt, zum Beispiel dem laktierenden Säugetier, wenn das Euter somatisch transgen gemacht werden soll, verabreicht. Dies kann entweder peroral durch Trinken der Flüssigkeit oder aber durch Zuführung über eine Magensonde, den Anus oder eine andere Körperöffnung erfolgen. Als Alternative kommt die Gabe der TGC-Amme durch Injektion in Betracht, die intravenös, intramuskulär direkt in das Zielorgan oder vorzugsweise intraperitoneal erfolgt. Als weitere Alternative kann die Infektion durch Bildung eines Aerosols und anschließende Inhalation der Tröpfchen erfolgen.

Der TGC-Wirt (Mensch oder Nutztier: Kuh, Pferd, Ziege, Schaf, Schwein, Hase, Geflügel etc.) kann mehrmals mit gleichen oder heterologen Transgenen infiziert werden. Durch mehrmalige Infektion mit unterschiedlicher DNA, die zum Beispiel für mehrere Enzyme eines Biosyntheseweges kodieren, können auf diese Weise ganze Enzymkaskaden in dem TGC-Wirt etabliert werden. Dadurch läßt sich auch die biochemische Expression multigener Proteine erreichen.

e) Organ- und Zellspezifität der Infektion:

Der weitere Weg der TGC-Amme im Organismus ist zunächst durch den natürlichen Infektionsweg bestimmt. Die TGC-Amme erreicht auf dem für sie typischen und vom jeweiligen Bakterium gesteuerten Weg das Zielorgan. Trägt die TGC-Amme im Fall von *L.monocytogenes* genetisch unveränderte Internaline, so ist das Euter unter den Zielorganen. Genetisch veränderte Internaline erlauben die Infektion anderer Organsysteme. Seinem Infektionszyklus entsprechend dringt die TGC-Amme in die Zellen ein und erscheint im Zytoplasma. Da sie genetisch defekt ist, kann die TGC-Amme sich dort nicht weiter vermehren, sie begeht

"endogenen Suizid" (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b)). Bei der Zellinfektion hat die TGC-Amme die wirtsfremde TGC-DNA in ihrem Gepäck in die Zelle eingeschleust. Die Übertragung der Fremd-DNA in die Zelle kann aber auch durch

5 "exogenen Suizid" (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b)) oder durch "Abtötung" der Bakterien durch gezielte Antibiose (siehe oben, C.3 unter Aufzählungspunkt (b)) ausgelöst werden. In diesen drei Fällen stirbt die Bakterienzelle, die die Fremd-DNA in sich trägt, innerhalb der animalen Zelle und

10 entläßt dabei die Fremd-DNA ins Zytoplasma. Schließlich kann die Übertragung der Fremd-DNA auf die animale Zelle auch durch gezielte Infektion der Zellen unter Ausbleiben der Lyse der Endosomen erreicht werden. Hierbei wird die Fremd-DNA der animalen Zelle durch Lyse der Bakterien innerhalb der

15 Endosomen zugänglich.

In jedem der angesprochenen Fälle steht die in die Zelle übertragene DNA nun als Template zur Produktion des gewünschten Fremdproteins zur Verfügung. Die Nukleinsäure kann aber auch direkt therapeutisch wirken, zum Beispiel durch Generie-

20 rung einer anti-sense RNA. Die so manipulierten Zellen, Gewebe oder Organe werden im Verlauf der Infektion somatisch transgen.

f) L.monocytogenes induzierte Proteinproduktion in der

25 Milch von Säugetieren:

Nach Ausführen des TGC-Verfahrens - zum Beispiel mit TGC-Ammen wie L.monocytogenes aber auch anderen intrazellulär vitalen Bakterien (z.B. Yersinien), oder ins Endosom eindringenden

30 (z.B. Salmonellen) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren aufgerüsteten, ansonsten nicht-pathogenen Bakterien (z.B. Escherichia coli oder L.innocua) - wird das Protein in der laktierenden Zelle gebildet und mit den anderen Produkten der Zelle in die Milch ausgeschieden. Werden mehrere

35 Tiere mit unterschiedlicher Fremd-DNA im TGC-Verfahren



- 15 -

somatisch transgen gemacht, so können durch Sammeln der Milch jedes einzelnen TGC-Wirtes (Melken) die unterschiedlichen Proteine voneinander getrennt produziert werden.

5 Aufgrund der Eigenschaften der TGC-Amme tauchen in der Milch keine L.monocytogenes (TGC-Ammen, d.h. Bakterien) auf. Sollte dies dennoch der Fall sein, so können die Bakterien mit allen dem Fachmann bekannten Methoden eliminiert werden, zum Beispiel durch Behandlung mit Antibiotika. Die Tiere (oder  
10 auch der Mensch) sind nach der Durchführung des "targeted genetic conditioning" (TGC) frei von lebensfähigen, gentechnisch veränderten Organismen und unterliegen damit keinen weiteren Sicherheitsbestimmungen. Der TGC-Wirt gibt die in ihn durch das TGC-Verfahren eingetragene genetische Information  
15 an die nachkommenden Zellen im Rahmen der üblichen Zellteilung weiter. Auf Abkömmlinge des TGC-Wirts wird die Information jedoch nicht übertragen, da die TGC-DNA sich nicht in der Keimbahn des TGC-Wirtes befindet. Das Umgehen (d.h. Auslassen) der genetischen Manipulation der Keimbahn des Gesamt-  
20 organismus und die gezielte Proteinproduktion im vorbestimmten Organ oder Gewebe des animalen Wirts (Tier und Mensch) stellt den innovativen und neuen Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens dar.

25 g) Infektionen von Geweben durch L.monocytogenes

Das Blut ist ein Gewebe, dessen erfindungsgemäße genetische Veränderung durch das TGC-Verfahren exemplarisch beschrieben wird. Die Zellen des Blutes eignen sich besonders für das TGC-  
30 Verfahren. Die Infektion von Zellen des Blutes läßt sich außerhalb des Körpers vornehmen. Die zu erzielende somatische Transgenität der Zellen kann ebenfalls außerhalb des Wirtes überprüft werden. Im Fall der attenuierten, auxotrophen Bakterien lassen sich die zum Wachstum der Zellen notwendigen  
35 Substanzen - als Beispiel für Auxotrophie dient hier die

- 16 -

Diaminopimelinsäure - dem Medium zufügen und so der Zeitraum der Lebensfähigkeit der Bakterien entsprechend dem Versuchsziel steuern. Durch anschließende Lyse der animalen Zellen kann dann überprüft werden, ob die intrazellulären Bakterien  
5 noch vital sind.

Zur Reimplantation in den Empfängerorganismus werden schließlich die transfizierten Zellen verwendet, die eine genau bekannte Menge an vitalen Bakterien enthalten. Im Einzelfall  
10 können dies so große Mengen an Bakterien sein, daß im Organismus weitere Organe infiziert werden. In anderen Fällen wird durch die Eliminierung vitaler Bakterien in vitro vor der Reimplantation in den TGC-Wirt die Transgenität gezielt auf das Gewebeblut beschränkt.

15 Die Reimplantation und damit verbunden die Disseminierung der transgenen Zellen mit oder ohne vitale Bakterien erlaubt die somatische Gentherapie von Zellen im Wirt, der in diesem Fall auch ein Mensch sein kann.

20 Das TGC-Verfahren ermöglicht es aber auch, extrakorporal Proteine zu produzieren. Dazu werden die TGC-Ammen in Eier von Geflügeltieren injiziert. Geeignete Techniken hierfür sind in der Impfstoffherstellung bei viralen Erregern bereits Stand der Technik. Im Verlauf der Bebrütung der Eier werden die  
25 Zellen im Ei infiziert, somatisch transgen und produzieren dann das Fremdprotein. Aus dem Ei läßt sich nach bekannten Verfahren das Fremdprotein aufreinigen. Bei dieser Form des TGC-Verfahrens bleibt die TGC-Amme in allen Phasen der  
30 Anwendung unter Laborbedingungen kontrollierbar. Die Menge des zu produzierenden Proteins hängt nur von der Injektion einer entsprechend großen Anzahl von Eiern ab.

- 17 -

h) Einsatz des TGC-Verfahrens zur somatischen Gentherapie:

Es gibt noch keine etablierte Form der somatischen Gentherapie. Derzeit wird die zur Transfektion eingesetzte  
5 Nukleinsäure im Inneren von Viren oder eingepackt in Liposomen vor Einflüssen der Außenwelt geschützt.

Viren haben den Nachteil, daß sie nur eine begrenzte Aufnahme-  
fähigkeit haben und daß bei hohen Infektionsdosen mit der  
10 Entwicklung ihrer vollen zytopathischen Effekte zu rechnen ist [32a]. Sie induzieren Immunreaktionen und können so selber angegriffen und zerstört werden. Einige Viren werden durch Serum inaktiviert und werden dann für die Gentherapie unbrauchbar. Hier ist besonders die mehrfache Gabe von Viren  
15 zur Gentherapie zu nennen, in deren Verlauf die Immunantwort des Wirtes angestoßen wird. Die Bildung einer gezielten gegen die Viren gerichteten Abwehr stellte sich zuletzt als ein wesentliches Problem der Verwendung von Viren im Rahmen der Gentherapie heraus.

20 Beim Einsatz von Liposomen ist die toxische Wirkung der Lipide zu berücksichtigen, die entzündliche Reaktionen auslöst.

Im Fall der in vivo Therapie gibt es noch erhebliche Defizite  
25 auf dem Weg zu Anwendung der bisher benutzten Systeme des Gentransfers. Für diese Form der Therapie wird gefordert [32b]:

(i) die Resistenz des Vektors gegen Abbau nach der in  
30 vivo Gabe im Körper,

(ii) die Gewebsspezifität, d.h. das gezielte Ansteuern des zu therapierenden Gewebes (Organs) und

- 18 -

- (iii) die Sicherheit, womit die Unschädlichkeit der nicht zu behandelnden Organe gemeint ist [32b].

Die in dieser Patentanmeldung aufgeführten Bakterien, die hier als Vehikel zum Gentransport und Gentransfer eingesetzt werden können sollen, sind idealerweise für den Gentransfer geeignet. Die Bakterien sind auf ihren jeweiligen Wirt bestens adaptiert und können in ihm ohne äußere Eingriffe, wie Antibiotika-Therapie für eine ausreichende Zeit überleben. Sie induzieren auf definierten Infektionswegen spezifische Erkrankungen und zeigen dabei zum Teil eine ausgeprägte Organotropie. Sie können erhebliche Fremd-DNA Mengen aufnehmen (z.B. natürlich vorkommende Plasmide haben Größen von mehreren 100 Kilobasen), so daß nicht nur c-DNA's sondern sogar größere Bereiche eines Chromosoms übertragen werden können. Schließlich können sie sicher eingesetzt werden, insbesondere wenn es sich um "Krüppelbakterien" handelt, wie sie oben beschrieben worden sind. Die genetischen Defekte der TGC-Amme in Kombination mit der vorgegebenen Antibiotika-Empfindlichkeit garantieren eine effiziente Eliminierung der Bakterien, nachdem sie ihre Aufgabe, den DNA-Transfer in die eukaryonte Zelle erfüllt haben.

**Beispiel:**

25

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des

- 19 -

Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.

5

- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen  $\beta$ -Globulinsgens kann die  $\beta$ -Thalassaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das  $\beta$ -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.

15

- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem  $\alpha$ -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Weg.

20

- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

25

i) Nachweis des Erfolges des TGC-Verfahrens

30

Der DNA-Transfer wird in der Maus bereits innerhalb der ersten 24 Stunden sichtbar, d.h. lange bevor eine spezifische Immunantwort gegen das Bakterium entstanden sein konnte. Gezeigt wurde dies durch die Produktion von  $\beta$ -Galactosidase oder von dem fluoreszierenden Protein EGFP in Zellkulturen

35

- 20 -

innerhalb von 24 Stunden. Der im Rahmen der Infektion zusätzlich auftretende "mitogene Effekt der Bakterien" begünstigt die Etablierung der DNA in der TGC-Zelle und ist damit erwünscht und für den Erfolg des TGC-Verfahrens  
5 vorteilhaft.

Zusammenfassend ist deshalb festzustellen, daß der Einsatz von Bakterien zur somatischen Gentherapie sicherer ist als die Gentherapie mit viralen Systemen. Die bakterielle Infektion  
10 kann gerichtet und örtlich begrenzt werden. Das Wachstum und damit die floride Infektion durch die Bakterien kann durch Ausschalten bestimmter bakterieller Faktoren verhindert werden. Außerdem kann das Wachstum der Bakterien in der eukaryonten Zelle genau beeinflusst und generell verhindert  
15 werden. Schließlich ist die Beendigung der bakteriellen Infektion durch den Einsatz von Antibiotika jederzeit möglich, d.h. die Infektion läßt sich örtlich, zeitlich und effektiv begrenzen.

20 Im folgenden wird am Beispiel von *L.monocytogenes* die Erfindung detailliert beschrieben:

**Beispiel 1: Die Herstellung von TGC-Sicherheitsstämmen**

25 Die *L.monocytogenes* Sicherheitsstämme werden durch gezielte genetische Veränderungen von primär pathogenen *L.monocytogenes* Stämmen hergestellt. Dabei werden mehrere Ebenen der Sicherheit parallel zueinander etabliert. Damit wird verhindert, daß durch Rückmutationen die Vitalität oder Pathogenität  
30 wieder entstehen können. Die Mutationen betreffen Gene, die (1) das Überleben der Bakterien in der Zelle beeinflussen, (2) die die Pathogenität der Bakterien im TGC-Wirt mindern und (3) die das Überleben der Bakterien in der Umwelt nach einer möglichen Ausscheidung verhindern.

- 21 -

- a) Erste Ebene der Sicherheit - Sicherheitsrelevante Eigenschaft: Überleben in der Umwelt (siehe oben, B.1 unter Aufzählungspunkt (b))

5 Die TGC-Ammen können dem TGC-Wirt entweder durch Injektion oder durch perorale Gabe appliziert werden. Bei peroraler Gabe kann es zu einem Überangebot an Bakterien und dadurch zur Ausscheidung von Bakterien kommen, die vom Organismus nicht aufgenommen werden. Damit diese ausgeschiedenen Bakterien  
10 keine Chance haben, in der Umwelt zu überleben, können die TGC-Sicherheitsstämme zusätzliche Mutationen enthalten, die das Wachstum der Bakterien in der Umwelt verhindern.

Als ein Beispiel hierfür wird das Ausschalten des cspL-Gens  
15 (cold shock protein der Listerien) angeführt. Das hat zur Folge, daß die Bakterien bei Temperaturen unter 20°C nicht mehr wachsen können. Das Wachstum und die Infektionsfähigkeit bei 37°C sind nicht beeinträchtigt, werden allerdings bei gleichzeitigen Mutationen gemäß a) und b) zusätzlich modu-  
20 liert. Das cspL-Gen, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen deletiert ist, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 2 dargestellt. Ein entsprechender cspL-deletierter Stamm ist unter der Bezeichnung L.monocytogenes EGD Delta cspL1 bei der DSM unter der Nr. 11883 hinterlegt worden.

25 Die erfindungsgemäß eingesetzten TGC-Sicherheitsstämme können nur auf speziellen Wachstumsmedien angezüchtet werden. Die Wachstumstemperatur muß dabei über 37°C betragen, unter 20°C ist ein Wachstum unmöglich. Die Bakterien besitzen eine  
30 eingeschränkte Pathogenität und vermögen nur noch in begrenzten, eng umschriebenen Arealen des TGC-Wirtes vorzudringen. Damit wird die Sicherheit des Systems für Mensch und Umwelt garantiert. Die TGC-Ammen sind außerhalb der artefiziellen Medien, hier speziell in der Wirtszelle, nicht mehr wachstums-  
35 fähig. Diese eingeschränkte intrazelluläre Lebensfähigkeit ist

- 22 -

gleichzeitig eine Voraussetzung für die Freisetzung der TGC-DNA in der Wirtszelle und damit für die Induktion der somatischen Transgenität im TGC-Verfahren.

- 5    b)    Zweite Ebene der Sicherheit - Attenuierung: verminderte Pathogenität (siehe oben, B.2 unter Aufzählungspunkt (b))

10    Die zweite Ebene der Attenuierung der TGC-Sicherheitsstämme umfaßt Mutationen in den Pathogenitätsfaktoren. Durch gezielte Mutationen in definierten Faktoren wird die Pathogenität der Bakterien abgeschwächt, die Apoptoseinduktion der infizierten Wirtszelle verhindert und gleichzeitig die Immunreaktion in eine gewünschte Richtung dirigiert. Die Mutationen schränken  
15    die intrazelluläre Motilität der Bakterien und damit ihre Ausbreitung in sekundäre Zellen ein. Dadurch wird die Infektion unter Beibehaltung der Behandelbarkeit durch bekannte Antibiotika auf die ausgesuchten Zielzellen begrenzt.

20    Aus Sicherheitserwägungen ist es wünschenswert, die intrazelluläre Ausbreitung der TGC-Amme nach der Infektion einzuschränken oder gar zu verhindern. Das genaue Wissen über die intrazelluläre Lebensweise und die Motilität der oben-  
25    genannten Bakterien ermöglicht es, definierte, stabile Mutanten mit verminderter Fähigkeit zur Infektion des TGC-Wirtes zu erzeugen.

Bei *L.monozytogenes* betreffen die in diesem Sinne attenuierten Mutationen zum Beispiel das hly-Gen mit der Folge der Blockade  
30    der Infektion der ersten Zelle. Als ein Beispiel für die Ausschaltung dieses Pathogenitätsfaktors ist der Stamm *L. monocytogenes* EGD Hly<sub>D491A</sub> hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsnummer DSM 11881 erhalten.



- 23 -

Ein anderes Beispiel für die Verminderung der Pathogenität von *L.monocytogenes* sind Mutationen im *actA*-Gen oder die Deletion von Regionen, die für die Interaktion zwischen *actA* und dem Wirtszellprotein VASP erforderlich sind, mit der Folge, daß  
5 die intrazelluläre Motilität blockiert ist. Schließlich gibt es auch Mutationen des *plcB*-Gen, wodurch den Bakterien die Möglichkeit genommen wird, sich in eine zweite Zelle hinein auszubreiten. Der hinterlegte Stamm *L. monocytogenes* EGD Delta *actA* Delta *plcB* ist ein Beispiel für eine doppelte Mutation,  
10 in der sowohl das *actA*-Gen als auch das *plcB*-Gen ausgeschaltet sind. Er trägt die Hinterlegungsnummer DSM 11882.

Außerdem ist es auch möglich, in *L.monocytogenes* das Wildtyp-*Listeriolysin*-Gen gegen ein mutiertes Allel auszutauschen.  
15 Dann werden die Eigenschaften des *Listeriolysin*, sowohl eine Apoptose in verschiedenen Wirtszellen zu induzieren als auch und eine starke T-Zellvermittelte Immunantwort zu generieren, eingeschränkt.

20 c) Überleben in der Zelle: - Endogener Suizid: 3. Ebene der Sicherheit (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b))

Allgemein zeichnen sich die für das TGC-Verfahren attenuierten Bakterien durch definierte Deletionen in den Genen aus, die  
25 für die Biosynthese integraler bakterieller Komponenten essentiell sind. Die ausgewählten auxotrophen Bakterien eignen sich als TGC-Amme, denn als attenuierte Bakterien können sie fremde DNA in die Zelle transportieren. Da die Bakterien jedoch in den Zellen von essentiellen "Wachstumsfaktoren"  
30 abgeschnitten sind, lysieren sie spontan und setzen dabei die TGC-DNA in der Zelle frei.

Als TGC-Sicherheitsstämme werden *L.monocytogenes* eingesetzt, die genetisch derart verändert sind, daß sie die Zelle zwar  
35 noch infizieren, sich aber in der Zelle nicht mehr vermehren

- 24 -

können. Dies wird u.a. durch die Inaktivierung des dapE-Gens in *L.monocytogenes* erreicht. Listerien sind Gram-positive Bakterien, die ebenso wie die Gram-negative Bakterien zur Vernetzung der Zellwand meso-Diaminopimelinsäurederivate (DAP) benötigen. Die Biosynthese von Diaminopimelinsäure ist daher für die Bildung der bakteriellen Zellwand essentiell. DAP-auxotrophe Bakterien unterliegen der spontanen Lyse, wenn diese Aminosäure im Kuluturmedium nicht mehr angeboten wird. Die Enzyme, die bei der DAP-Synthese im Bakterium beteiligt sind, sind in Säugerzellen nicht vorhanden. In TGC-Sicherheitsbakterien sind eben diese Enzyme deletiert oder durch Insertionen oder auf eine andere Weise inaktiviert. Das dapE von *L.monocytogenes*, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen inaktiviert wurde, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 1 dargestellt. Zur genetischen Manipulation des dapE Gens in *L.monocytogenes* mußte dessen Sequenz bestimmt werden, den entsprechende Gene z.B. aus *E.coli* weisen lediglich eine ca 30%ige Homologie zur Sequenz des SEQ ID No. 1 Protokoll auf.

Die dieses oder anderer Gene des DAP-Biosyntheseweges beraubten Bakterien, sog. DAP-Mutanten, können weder innerhalb noch außerhalb des Wirtes wachsen. Dazu benötigen sie den Zusatz von großen Mengen an DAP (1mM) zum Wachstumsmedium. Fehlt es an DAP, kann das Bakterium weder im TGC-Wirt noch außerhalb des TGC-Wirts überleben. Damit bieten diese DAP-Mutanten sowohl Sicherheit vor einer bakteriellen Infektion des TGC-Wirtes als auch Sicherheit vor einer Infektion anderer Organismen im Falle der Freisetzung eines derartigen Stammes in die Außenwelt.

Ein Eingriff ins Genom von Salmonellen mit entsprechender Auswirkung (Schaffung einer auxotrophen Mutante) stellt die Deletion (oder Blockade oder Mutagenese) des *aroA* Gens dar, das zur Synthese aromatischer Aminosäuren essentiell ist. Aus

dem Salmonellen Impfstamm (zugänglich bei der amerikanischen Stammsammlung unter ATCC14028) läßt sich durch genetische Manipulation mit Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, und in Kenntnis des *aroA* Gens (Genebank Annahme-Nummer M 10947) eine Mutante gewinnen, die analog den hier für Listerien beschriebenen rekombinanten Bakterien als TGC-Sicherheitsstamm fungieren kann. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt, wie für den oben beschriebenen *L.monocytogenes* delta *dapE* Stamm, durch Absterben der Bakterien nach Aufnahme in die Zelle. Anderes als *L.monocytogenes* vermögen Salmonellen nicht in das Zytoplasma der Zelle zu gelangen. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt in diesem Fall aus den Endosomen ins Zellinnere.

Es sind auch noch andere attenuierte Mutationen von *L.monocytogenes* bekannt, in denen die Biosynthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren, Zuckern oder anderen Zellwandbausteinen blockiert ist [33 bis 35]. Gleiches kann auch durch Mutationen in regulatorischen Genen erreicht werden, die für den intrazellulären Lebensstil der Bakterien essentiell sind. Beispielhaft für ein derartiges Gen ist *phoP* von *Salmonella typhimurium* [36].

Die hier aufgeführten Beispiele für *L.monocytogenes* sind auf andere intrazellulär vitale Bakterien oder Bakterien übertragbar, die erst durch Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren zu intrazellulären Erregern gemacht werden. Dies gilt insbesondere für Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* (besonders *E.coli*, Salmonellen, Shigellen, Yersinien), *Mycobacterium*, *Renibacterium* und *Rhodococcus*. Ein in diesem Sinn aufgerüsteter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem Listeriolysin aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist.

- 26 -

Eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung von DNA selbst in "abgelegene" Körperzellen ist der Schutz der DNA auf dem Weg bis zur Zielzelle oder dem Zielgewebe oder dem Zielorgan. Die Fähigkeit intrazellulär vitaler Bakterien wie L.monocyto-

5 genes zur intrazellulären Ausbreitung ist eine ideale Eigenschaft, Gene in abgelegene Zellen, in tiefere Gewebe und Organe zu transportieren. Nach erfolgreichem Transfer der TGC-DNA in die Zielzelle verstirbt der Bote, die TGC-Amme, in Folge der Attenuierung (B.1), der Induktion von Auxotropien

10 (B.2), des endogenen Suizids (C.1), der Infektion über Endosomen (C.2), der Infektion über Phagolysosomen (C.3), des exogenen Suizids (C.4) oder der Antibiotikatherapie (D.1).

**Beispiel 2: Freisetzung der Fremd-DNA in der animalen**

15 **Zelle (synonym: Gewebe; Organ)**

a) Infektion über Endosomen: Transfer des Expressionsplasmids ohne Befreiung der Bakterien aus dem Endosomvesikel (siehe oben, C.2 unter Aufzählungspunkt (b))

20 Es wurde getestet, ob Bakterien in der Lage sind, ihre Plasmid-DNA ins Zytoplasma infizierter Wirtszellen zu übertragen, ohne daß sie sich vorher aus dem Endosomvesikel befreit haben müssen. Dazu wurde die Fähigkeit der L.

25 monocytogenes Dhly Mutante, die nicht mehr aus dem Endosom austreten kann, untersucht, als übertragendes Bakterium für den DNA-Transfer zu fungieren. Als zu übertragende Fremd-DNA wurde EGFP gewählt, ein fluoreszierendes Protein, das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert war. Als Maß für

30 die erfolgreiche Übertragung der Fremd-DNA - d.h. als Maß für die Transfektion der eukaryonten Zelle - wurden 10.000 Zellen im FACS-Scanner nach Infektion mit den jeweiligen L.monocyto-

35 genes Stämmen auf das Vorkommen der EGFP-ausgelösten Fluoreszenz untersucht. Die Anzahl ist in Tabelle 1 in % der Gesamtzahl der gemessenen eukaryonten Zellen ausgedrückt. Bei

- 27 -

den Experimenten diente der *L. monocytogenes* Wildtyp-Stamm EGD als positiv Kontrolle. Geprüft wurde auch eine isogener, nicht invasiver  $\Delta$ InlAB Stamm. Die Aussagen, die mit diesen Bakterien gewonnen wurden, haben Allgemeingültigkeit und sind auf andere Bakterien übertragbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und zeigen, daß die Dhly Mutante in Bezug auf den DNA-Transfer vom Bakterium in die eukaryonte Zelle genauso effizient ist, wie der *L. monocytogenes* Wildtyp-Stamm. Der *L. monocytogenes*  $\Delta$ InlAB Stamm ist als Vehikel für DNA-Transfer in die hier angegebenen Zellen nicht (PtK2) oder aber wesentlich schlechter (Hep-2) geeignet. Die Experimente zeigen weiterhin, daß die aktive Aufnahme der Bakterien durch die eukaryonte Zelle (in diesem Fall keine professionellen Phagozyten) die Voraussetzung für die Transfektion der Zellen ist. Die Anheftung der Bakterien wird durch die Interaktion zwischen bakteriellen Internalinen (InlA und/oder InlB) und den Rezeptoren der animalen Zellen bewirkt. Die Experimente des folgenden Beispiels zeigen, daß Internaline zur Aufnahme von Bakterien in professionelle Phagozyten nicht notwendig sind.

Zell- linie	Ursprung	<i>L. monocytogenes</i> - Stamm	Transfizierte Zellen in %
PtK2	Kangaroo rat kidney	Wildtyp EGD	1.71
		$\Delta$ hly	1.78
		$\Delta$ inlAB	0
Hep-2	human larynx carcinoma	Wildtyp EGD	4.58
		$\Delta$ hly	4.31
		$\Delta$ inlAB	0.24

b) Infektion über Phagolysosomen: Aufrüstung nicht pathogener Stämme zum TGC-Sicherheitsstamm: (siehe oben, C.3 unter Aufzählungspunkt (b))

- 28 -

Das im folgenden für *L. innocua* dargestellte Beispiel ist exemplarisch und kann auf andere nicht pathogene Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) übertragen werden. Die auszuführenden Eingriffe in die genetische Ausstattung solcher Bakterien  
5 entsprechen den hier für *L. innocua* angeführten.

Ein nicht pathogener *L. innocua* Stamm (Sero var 6a) wurde mit dem Pathogenitätsfaktoren Listeriolysin und ActA aus *Listeria monocytogenes* "aufgerüstet". Um die Expression dieser Gene  
10 regulieren zu können, wurde als drittes Gen der in trans positiv-wirkende Transkriptionsfaktor (PrfA) in den gentechnisch manipulierten *L. innocua* Stamm einkloniert. Die Gegenwart von PrfA macht die Expression der Virulengene von der Wachstumstemperatur abhängig. Da dieser rekombinante  
15 *L. innocua* Stamm keine Internaline besitzt, d.h. von sich aus nicht invasiv ist, kann er nicht in die oben erwähnten Zellen (Ptk2; Hep-2) eindringen. Wünscht der Experimentator zusätzlich auch solche Zelle infizieren zu können, so müssen die Bakterien zusätzlich mit den Internalinen InlA und/oder InlB  
20 ausgestattet werden. Die Experimente des vorliegenden Beispiels zeigen, daß es zur Aufnahme des *L. innocua* (hly+; actA+) Stammes durch professionelle Phagozyten dieser bakteriellen Produkte (Internaline) nicht bedarf. Nach ihrer Phagozytose setzt der *L. innocua* Stamm (hly+; actA+) das Eiweiß  
25 Listeriolysin zur Lyse der Phagolysosomen der professionellen Phagozyten ein. Im elektronenmikroskopischen Bild ist zu erkennen, daß der genetisch manipulierte *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm im Zytoplasma der professionellen Phagozyten auftaucht. Der Wildtypstamm *L. innocua* Sero var 6a hingegen wird  
30 im Phagolysosom abgetötet und erscheint nicht im Zellzytoplasma. Die Expression des ActA-Proteins erlaubt dem *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm eine Aktin-Zytoskelett abhängige intrazelluläre Bewegungen, die im EM-Bild der Bewegung der *L. monocytogenes* Stämme ähnlich sieht. Auf Grund des Fehlens  
35 weiterer Gene, wie z.B. des plcB Gens, kann sich der hier

erwähnte L.innocua (hly+; actA+) Stamm nicht auf Nachbarzellen ausbreiten. Diese spezifische Änderung in der Infektiosität wurde bereits für rekombinante L.monocytogenes AplcB Stämme beschrieben.

5

Die gezielte Auswahl von Genen, hier hly und actA, und deren Transformation in nicht pathogene Bakterien, überträgt die ausgewählten L.monocytogenes Eigenschaften auf nicht pathogene Bakterien. Die Befreiung der Bakterien aus dem "tödlichen" Phagolysosom ist die Voraussetzung für den Transfer fremder DNA in die infizierten Zellen. Die zur Umprogrammierung der animalen Zelle zu übertragende DNA wird dabei in Konstrukte integriert, wie sie oben bereits für attenuierte L.monocytogenes Bakterien - die bereits als solche erfindungsgemäß eingesetzt werden können - beschrieben wurden. Die Freisetzung der genetischen Information erfolgt erfindungsgemäß durch (i) Schaffung auxogener Mutanten (Deletion endogener, lebensnotwendiger Gene), durch (ii) Einführung von "Suicid-Genen", (iii) durch induzierte Aufnahme in Endosomen und Abtötung darin oder (iv) durch eine zeitlich definierte und auf die Abtötung der Bakterien in einem Zielorgan oder Gewebe bezogene Antibiotikatherapie.

Die Experimente dieses Beispiels zeigen exemplarisch, wie von Hause aus nicht pathogene Bakterien sukzessiv "aufgerüstet" werden können. Durch Ausrüstung mit definierten bakteriellen Faktoren (hier Gen d.h. Eigenschaften natürlich invasiver Bakterien) lassen sich ansonsten für das TGC-Verfahren primär ungeeignete Bakterien, von Experimentator derart manipulieren und steuern, daß sie für eine kontrollierte Infektion und Übertragung von DNA in die animale Zelle (synonym: Gewebe, Organ, Ganztier, Mensch) eingesetzt werden können.

c) Freisetzung durch exogenen Suizid: Einklonierung von Suizidgenen: (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b))

- 30 -

Suizid-Gene, die nach dem Eindringen in die Wirtszelle aktiviert werden und zum Absterben der Bakterien führen, können den Bakterien in Form von Lysisgenen aus Bakteriophagen, zum Beispiel mit dem S-Gen des Bakteriophagen Lambda oder  
5 Analoga [37], oder mit Killergenen aus Plasmiden [38] zugeführt werden. Diese Gene stehen unter der Kontrolle eines intrazellulär induzierbaren Promotors (zum Beispiel pagC-Promotor aus Salmonella [38]).

10 d) Freisetzung durch Antibiotikatherapie: Gezielte Freisetzung von Fremd-DNA in der Lunge nach Tröpfchen-Infektion von *Listeria monocytogenes* (siehe oben, D.1 unter Aufzählungspunkt (b))

15 Die Infektion mit den Bakterien erfolgte nach dem Verfahren der "Body plethysmography in spontaneously breathing mice" gemäß R. Vijayaraghavan [Arch. Toxicol. 67: 478-490 (1993)]. Bei dem Versuch wurden die Mäuse einzeln in einer Inhalationskammer für eine halbe Stunde einem Aerosol von einem Milli-  
20 liter Bakteriensuspension ausgesetzt, das insgesamt 5000 Bakterien enthielt. Diese Anzahl von Bakterien entspricht einer LD50 Dosis bei intraperitonealer Gabe der Bakterien. Um den Verlauf der Infektion in Echtzeit verfolgen zu können, wurden die Bakterien erneut mit einem EGFP-Genkonstrukt  
25 transformiert. Durch Fluoreszenzanalyse des im Gewebe gebildeten EGFP-Proteins wurde der Weg der Bakterien im Tiermodell verfolgt. Demnach dringen die Bakterien innerhalb einer halben Stunde in die Säulen- und Endothel-Zellen des Luftweges ein. Zu diesem Zeitpunkt sind keine Bakterien in  
30 anderem Gewebe bzw. Organen des infizierten Tiers, wie z.B. Milz, Leber, Gehirn, zu finden. Die Infektion bleibt für bis zu 18 Stunden ausschließlich auf die Lunge begrenzt. Erst nach 24h werden auch andere Organen befallen.



- 31 -

Der Versuch zeigt, daß die Ausbreitung der Bakterien nach Tröpfcheninfektion auf das Primärorgan begrenzt werden kann, wenn in deren Lebensfähigkeit eingegriffen wird. Zwei Wege, dies zu erreichen, sind die Verwendung attenuierter Mutanten (z.B. deletiert im "Ausbreitungsgen" ActA) und/oder die Zerstörung der Bakterien durch Antibiotika-Therapie Zugabe zu einem vom Experimentator vorgegebenen Zeitpunkt, d.h. in einem vom Experimentator vorgegebenen Organ.

### 10 Beispiel 3: Beschreibung der TGC-Vektoren

TGC-Vektoren sind episomale DNA, zum Beispiel Plasmide mit geringer Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA (pMB-Abkömmlinge, die für einzelne Gene ausreicht), oder mit größerer DNA-Aufnahmefähigkeit (wie bei Pl- oder F-Plasmiden), um die somatische Transgenität für komplexe Biosynthese-Wege zu schaffen.

In allen Fällen handelt es sich um Plasmide, die in den zur genetischen Veränderung und zur Anzucht für das TGC-Verfahren eingesetzten Bakterien Wirten repliziert werden. Als Beispiel für einen Zwischenwirt, in dem genetische Bausteine konstruiert werden können, eignen sich E.coli oder andere in der rekombinanten DNA-Technologie üblicherweise eingesetzte Bakterien. Als TGC-Sicherheitsstamm eignet sich unter anderem L.monocytogenes oder die anderen obengenannten Bakterien, die als TGC-Amme fungieren. Um diese Bedingung zu erfüllen, enthalten die Plasmide die wirtsspezifischen Plasmid-Replikon-Sequenzen. Bei der Erzeugung der rekombinanten DNA müssen transformierte von "nackten" Wirtszellen unterschieden werden. Als Selektionsprinzipien können dabei die gängigen Antibiotikaresistenzgene eingesetzt werden.

- 32 -

**Beispiel 4: Transformation von L.monocytogenes-Sicherheitsstämmen zu TGC-Ammen**

Die Transformation von L.monocytogenes erfolgt nach einem  
5 modifizierten Protokoll von Park und Stewart [40].

Dazu werden Bakterien bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600}$   
= 0,2 angezogen. Dem Anzuchtsmedium wird Ampicillin ( $10\mu\text{g/ml}$ )  
und 1 mM Glyzin zugegeben. Es erfolgt dann eine weitere  
10 Vermehrung bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bis 1,0. Die Zellen  
werden durch Abzentrifugation geerntet und in 1/250 Vol.  
kaltem Elektroporationspuffer (1 mM Hepes, pH 7,10; 0,5 M  
Sucrose) aufgenommen. Als Vorbereitung zur Elektroporation  
werden die Bakterien bis zu viermal gewaschen.

15

Zur Elektroporation werden  $50\mu\text{l}$  der vorbereiteten Zellen in  
eine Elektroporationsküvette gegeben, die Elektroporation  
erfolgt bei 10 kV/cm, 400 Ohm, 25  $\mu\text{F}$  unter Einsatz von ca 1  $\mu\text{g}$   
DNA.

20

Danach kommen die Zellen sofort auf Eis und werden in 10-  
fachem BHI-Medium aufgenommen und für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  unter  
vorsichtigem Schütteln bebrütet. Nach dieser Zeit werden die  
Zellen ausplattiert und bei der gewünschten Temperatur  
25 bebrütet. Die Effizienz der Transformation nach dieser Methode  
beträgt  $10^4$  bis  $10^5$  Transformaten pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid  
DNA.

30

**Beispiel 5: Beschreibung der Anzucht von TGC-Ammen zum  
Einsatz im TGC-Verfahren**

Listerien wurden bevorzugt in der Brain-Heart-Infusion Broth  
zum Beispiel BHI der Firma Difco angezüchtet. Alternativ und  
für spezielle Anwendungen (radioaktive Markierung listerieller  
35 Proteine) können die Bakterien in Tryptic Soy broth (TSB) oder

in Listerien Minimal Medium (LMM) gezüchtet werden [36]. Die Bakterien werden abzentrifugiert und mehrfach im geeigneten Transfer-Medium, zum Beispiel einem Bicarbonat-haltigen Puffer, gewaschen.

5

Derart vorbereitete Bakterien können unter Zusatz von 15% Glycerin Lösung bei -80°C für mindestens 6 Monate aufbewahrt werden, bevor sie in das TGC-Verfahren eingesetzt werden.

10 **Beispiel 6: TGC-Verfahren - Verfüttern der TGC-Ammen**

Zur Einleitung des TGC-Verfahrens wird den Tieren für einige Stunden das Trinkwasser entzogen. Die (TGC-Ammen: TGC-DNA im gewünschten TGC-Stamm) werden in einem Bicarbonat-haltigen  
15 Puffer geeigneter Konzentration aufgenommen und den Tieren oral, durch Inhalation oder per Injektion (parenteral, intramuskulär, intraperitoneal oder direkt in das gewünschte Zielorgan) verabreicht. Die Art der Applikation richtet sich nach dem physiologischen Infektionsweg der entsprechenden TGC-  
20 Amme. Die Auswahl des Keimes der als TGC-Sicherheitsstamm eingesetzt wird, richtet sich nach Zielorgan und wird entsprechend des Infektionsweges und entsprechend des Organotropismus des jeweiligen Bakteriums festgesetzt. Die Dosis an Bakterien wird so gewählt, daß die gewünschte  
25 organotrope Einschleusung der TGC-Amme erzielt wird. Die Menge und die Art der Applikation der Bakterien richtet sich dabei nach dem jeweiligen Bakterium, ist aber auch vom Wirt und dem Zielorgan abhängig (siehe auch Beispiel 2).

30 **Beispiel 7: Durchführung der somatischen Gentherapie**

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- 34 -

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.
- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen  $\beta$ -Globulingen kann die  $\beta$ -Thalasaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das  $\beta$ -Globulingen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.
- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem  $\alpha$ -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Punkt.
- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

**Beispiel 8: Kontrolle für den Erfolg der induzierten somatischen Transgenität**

Nach dem Transfer der TGC-DNA in den TGC-Wirt ist der Erfolg  
5 des TGC-Verfahrens nachzuweisen. Dazu eignen sich immunologi-  
sche Nachweise des Genproduktes (Proteins) durch Immunoassays  
wie den ELISA, den Immunoblot oder andere bekannte Nachweise,  
die auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhen. T-Zell-  
Antworten können in speziellen Assays abgerufen werden und  
10 werden immer dann angewendet, wenn es sich bei dem Antigen um  
eine Substanz handelt, die über MHC-Klasse I vermittelte  
Immunantworten erkannt wird.

Handelt es sich bei dem produzierten Protein um ein Enzym,  
15 so kann dessen biologische Aktivität in Form der enzymatischen  
Aktivitätstestung erfolgen. Besitzt das Protein zusätzlich  
eine biologische Aktivität, so wird die Leistungsfähigkeit des  
gebildeten Proteins durch biologische Assays abgerufen.

20 Für Proteine, die eine passive oder aktive Immunisierung des  
TGC-Wirtes induzieren, wird die Protektion gegenüber dem  
auslösenden Agens getestet. Es kann sich zum Beispiel um die  
Verhinderung der Besiedlung, der Infektion (oder der apparen-  
ten Erkrankung) des Versuchstieres nach Belastung mit dem  
25 pathogenen Organismus (Bakterium oder Virus) handeln.

**Beispiel 9: Ernte des Proteins**

Die Gewinnung des produzierten Proteins erfolgt durch  
30 Techniken, die jeder in der Landwirtschaft tätigen Person  
bekannt sind:

- ist der TGC-Wirt eine Kuh oder ein anderes laktierendes  
Nutztier und das Euter das infizierte Organ, so werden  
35 die bekannten Techniken des Melkens eingesetzt;

- 36 -

- wenn Geflügeltiere wie Hühner als TGC-Wirt eingesetzt wurden, so werden die Eier gesammelt und der Protein-Reinigung zugeführt;
- 5 - die Aufarbeitung von Proteinen aus Organen, deren Produkte nicht nach außen abgegeben werden, erfolgt durch die Gewinnung des entsprechenden Organs, wozu in der Regel eine Schlachtung nötig sein wird, zum Beispiel bei Fischen;
- 10 - ist das Blut das somatisch transgene Gewebe, so wird das gewünschte Produkt nach Venenpunktion aus dem Blut oder seinen Zellen gewonnen und mit dem Fachmann bekannten Methoden aufgereinigt.

15

#### **Beispiel 10: Anreinigung des Proteins**

Eine Vorreinigung des zu produzierenden Proteins erfolgt durch Trennungsverfahren, die sich primär physikalischer oder  
20 physikochemischer, dem Fachmann wohl bekannter Methoden bedienen. Dazu gehören Fällungen der Proteine mit Salzen (zum Beispiel Ammoniumsulfat), mit Säuren (zum Beispiel Trichlor-essigsäure) oder unter Einwirkung von Hitze oder Kälte.

25 Eine grobe Trennung wird auch mittels der Säulenchromatographie erreicht. Alle hier eingesetzten Verfahren richten sich sehr stark nach den primären Medien, in denen sich das jeweilige Protein anreichert. So sind zum Beispiel für die Aufarbeitung von Milch oder Eiern in der Industrie viele  
30 Methoden bekannt, die auch auf die hier geschilderte Erfindung anwendbar sind. Gleiches gilt für die Aufarbeitung von Blut als somatisch-transgenes Gewebe. Hier kann auf die Erfahrungen auf die Transfusionsmedizin, spezielle auf die Aufarbeitung und Reinigung von Blutgerinnungsfaktoren zurückgegriffen  
35 werden.

**Beispiel 11: Reinigung des Proteins**

Zur endgültigen Reinigung der Proteine sind alle Methoden einsetzbar, die für konventionelle Reinigungen von Proteinen

5 Anwendung finden. Dazu gehören

- die Reinigung mittels Affinitätschromatographie zum Beispiel unter Ausnutzung der Rezeptor-Ligand Interaktion;
- 10 - die Darstellung von Fusionsproteinen mit sog. "Tags", die zur spezifischen Interaktion mit einer Matrix der Chromatographie eingesetzt werden können (zum Beispiel Poly-Histidin-Tag und Nickel-Säulen-Chromatographie; die
- 15 Streptavidin-Biotin Technologie der Affinitätsreinigung). Die Tags können bei fachgerechter Einführung einer entsprechenden Proteaseschnittstelle durch späteren Proteasen-Verdau wieder entfernt werden;
- 20 - die Reinigung mittels spezifischer Antikörper (Immunaффinitätschromatographie);
- die Ausnutzung natürlicher Affinitäten zwischen dem Zielprotein und anderen Proteinen, Kohlehydraten oder
- 25 anderen Bindungspartnern wie im Fall des Toxin A von Clostridium difficile, dessen Bindungsfähigkeit an Thyroglobin bei 4°C und dessen anschließender Elution durch Temperaturerhöhung auf 37°C.

30 **Beispiel 12: Produktion von TGC-Proteinen:**

Die Liste der durch das TGC-Verfahren herstellbaren Proteine ist theoretisch unbegrenzt und umfaßt vor allem den Bereich der Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren,

35 humane monoklonale Antikörper sowie die Herstellung von

- 38 -

Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur ungefährlichen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Es handelt sich dabei sowohl um Massenartikel wie humanes Serumalbumin als auch um

5 Proteine, die in geringen Mengen eingesetzt werden wie Hirudin, Blutgerinnungsfaktoren, Antigene zur Tumorphylaxe und zur aktiven Immunisierung (zum Beispiel Papilloma-Antigen) sowie um Antikörper zur passiven Immunisierung.



**Literaturverzeichnis:**

- 5 1. Cossart P. und B.B. Finlay "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens Science 276: 718-725.
2. Falkow, S., Isberg, R.R. und Portnoy D.A. (1992) The  
10 interaction of bacteria with mammalian cells Ann. Rev. Cell Biol. 8:333-63.
3. Weinberg, A.N. Zoonoses S. 291-2795; In Principle and Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, Douglas und  
15 Bennett, J.E. und Dolin R. Churchill Livingstone New York, 1995.
4. Farber J.M. und Peterkin, P.J. (1991) *Listeria monocytogenes* - a foodborne pathogen Microbiol. Rev. 55: 476-511.  
20
5. Thoen C.O. (1994) Tuberculosis in wild and domestic animals pp. 157-62, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control ; ASM, Washington DC 20005.
- 25 6. von Hase, U., Pulz, M., Windorfer, A: EHEC in Niedersachsen, Januar 1995 - August 1997. Niedersächs. Ärztebl (1997) 20-23 u 38-40.
7. Swaminathan B., Rocourt J., und Bille J.. (1995)  
30 *Listeria*. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray, P.R., Baron E.J., Tenover F.C., und Tenover R.H. S.341-348. ASM-Press Washington DC.
8. Hof, H., Nichterlein, T. und Kretschmar, M. (1997)  
35 Management of Listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 10: 345-357.

- 40 -

8a. Simon, C. und Stille, W. Antibiotikatherapie, Schattauer-  
erverlag,

9. Chakraborty, T. und Wehland, J (1997) The host cell  
5 infected with *Listeria monocytogenes* pp. 271-290; in Host  
response to intracellular pathogens, Ed. S.H.E. Kaufmann R.G.  
Landes co., Austin, USA.

10. Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und  
10 Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* is mediated by  
internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens  
from gram-positive cocci Cell: 65; 1127-1141.

11. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nicht-  
15 erlein, T., Wehland, J. und T. Chakraborty (1995) Expression  
of *inlA* and *inlB* in *L. monocytogenes* EGD, whose products  
mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by  
*PrfA*-dependent and - independent mechanisms Infect. Immun. 63:  
3896-3903.

20 12. Alvarez-Dominguez, C., Carasco-Martin, E. und  
Levy-Cobian F (1993) Role of complement component *Clq* in  
phagocytosis of *L. monocytogenes* by murine macrophage-like  
cell lines . Infect. Immun. 61: 3664-3672.

25 13. Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. und  
Joiner, K.A. (1994) The type I macrophage scavenger receptor  
binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic  
acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1863-7.

30 14. Gaillard, J-L, Berche, P. und Sansonetti, PJ (1986)  
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of  
hemolysin in virulence of *Listeria monocytogenes* Infect.  
Immun. 52: 50-55.

35

- 41 -

15. Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. und Mitchison, T.J. (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in cells and cell-free extracts. *Cell* 76: 505-517.
- 5
16. Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, CJ, Jockusch, BM., Reinhard, M., Walter, U. und Wehland, J. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile
- 10 *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells *EMBO J.* 14: 1314-21.
17. Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Goeffroy, C., Mengaud, J. und Cossart, P. (1992) Nucleotide
- 15 sequence of the lecithinase operon of *L. monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60: 219-30.
18. L'Hopital, S.J., Marly, J., Pardon, P. und Berche, P.
- 20 (1993) Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J Clin. Microbiol.* 31: 1537-40.
19. Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. und Chakraborty, T. (1997)
- 25 Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* 65: 101-9.
- 30 20. Grenningloh, R., Darji, A., Wehland, J., Chakraborty, T. und Weiss, S. (1997). Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 65: 3976-3980, 1997.

- 42 -

21. Shen, H., Slifka, M.K., Matloubian, M., Jensen, E.R.,  
Ahmed, R. und Miller, J.F. (1995) Recombinant *Listeria*  
*monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of  
protective anti-viral cell-mediated immunity. Proc. Natl.  
5 Acad. Sci. USA. 92: 3987-91.
22. Slifka, M.K., Shen, H., Matloubian, M., Jensen, E. R.,  
Miller, J.F. und Ahmed, R. (1996) Antiviral cytotoxic T-cell  
memory by vaccination with recombinant *Listeria monocytogenes*.  
10 J. Virology 70: 2902-10.
23. Jensen, E.R., Selvakumar, R., Shen, H., Ahmed, R.,  
Wettstein, F.O. und Miller J.F. (1997) Recombinant *Listeria*  
*monocytogenes* Vaccination Eliminates Papillomavirus-Induced  
15 Tumors and Prevents Papilloma Formation from Viral DNA. J.  
Virol. 71: 8467-8474.
24. Schafer, R., Portnoy, D.A., Brassell, S.A. und Paterson,  
Y. (1992). Induction of a cellular immune response to a  
20 foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes*  
vaccine. J. Immunol. 149: 53-9.
25. Ikonmidis, G., Paterson, Y., Kos, F.J. und Portnoy, D.A.  
(1994). Delivery of a viral antigen to the class I processing  
25 and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. J. Exp.  
Med. 180: 2209-18.
26. Frankel, F.R., Hegde S., Lieberman, J. und Paterso, Y.  
(1995) Induction of cell-mediated immune responses to human  
30 immunodeficiency virus type 1 Gag protein by using *Listeria*  
*monocytogenes* as a live vaccine vector. J. Immunol. 155:  
4775-82.
27. Pan, Z.K., Ikonmidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D. und  
35 Paterson, Y. (1995) A recombinant *Listeria monocytogenes*

vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nature Med.* 1: 471-7.

- 5 28. Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. und Cossart, P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *L. monocytogenes* is regulated by bacterial growth, temperature and the pleiotropic activator, *prfA*. *Mol. Microbiol.* 9: 931-41.
- 10 29. Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P. und Leyva-Cobian F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* 65: 78-88.
- 15 30. Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. und Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *L. monocytogenes* required for host microfilament interaction with homology to the proline rich region of vinculin. *EMBO. J.* 11: 1981-1990.
- 20 31. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, M. und Cossart, P. (1992) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521-31.
- 25 32. Armstrong, D. *Listeria monocytogenes* (1995) In *Principle and Practice of Infectious Diseases*, Eds. Mandell, Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R.. S.1880-1885. Churchill Livingstone New York, 1995.
- 30 32a. Boucher, R.C. (1996). Current status of CF gene therapy. *Trends in Genetics* 12: 81-84.
- 35

- 44 -

32b. Bank A. (1996). Human somatic cell gene therapy. *BioEssays* 18: 999-1007.

5 33. O'Callaghan D, Maskell D, Tite J, Dougan G (1990). Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. *Immunology* 69:184-189.

10 34. Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S:S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S., und Levine, M.M. (1997). Safety of Live Oral *Salmonella typhi* Vaccine Strains with deletions in *htrA* and *aroC*, *aroD* and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65: 452-456.

15 35. Curtiss III, R. (1989) Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In *New generation vaccines: The molecular approach* (ed. M.M. Levine und G. Woodrow) p. 161. Marcel Dekker, New York.

20 36. Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.-P., Schödel, F., Potts, A, Peterson, D., De Grandi, P., und Nardeli-Haefliger, D. (1995). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect. Immun.* 63: 3279-3286.

25 37. Berkmen, M., Benedik, MJ., und Blasi, U. (1997). The *Serratia marcescens* NucE protein functions as a holin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 6522-6524.

30 38. Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., und Timmis KN (1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol. Microbiol.* 13: 855-861.

39. Hohmann, El., Oletta, CA., Loomis, WP, und Miller, SI (1995). Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92:2904-2908.
- 5
40. Park S.F. und Stewart G.S. (1990). High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94:129-132.
- 10
41. Premaratne, R.J., Lin, W.J. und Johnson E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3046-48.

**Patentansprüche:**

- 5 1. TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität in einem animalen Wirt, dadurch gekennzeichnet, daß Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten, unter der Kontralle eukaryonter, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und  
10 Expression stehender Fremd DNA bei der Infektion eines ganzen Organismus im Wirt die Fremd-Gene freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.
- 15 2. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines Organs durch gezielte Perfusion oder in Kultur Fremdgene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im Organ bewirken.
- 20 3. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines animalen Gewebes Fremd-Gene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im  
25 Gewebe bewirken.
4. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines Gemisches von Zellen oder einer einzelnen Zelllinie Fremd-Gene freisetzen und damit  
30 die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein in den einzelnen Zellen des Gemisches oder in der Zelllinie bewirken.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch geeignet  
35 ist, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirts-



- 47 -

organismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden oder fremden Proteins veranlaßt oder durch die Bildung von einzel- oder doppelsträngiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins oder die Wirkung einer Nukleinsäure im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA

- a) zur somatischen Gentherapie oder
- b) zum immunologischen Schutz vor mikrobiellen Erregern oder
- c) zum immunologischen Schutz vor Tumorerkrankungen

eingesetzt und prophylaktisch oder therapeutisch wirkt.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Bakterien der Gattungen Aeromonas, Bartonella, Brucella, Campylobacter, Clostridia, Enterobacteriaceae, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Renibacterium, Rhodococcus oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen eingesetzt werden, die im eukaryonten Wirtsorganismus intrazellulär lebensfähig sind.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien durch Auswahl und genetische Manipulation endogener bakterieller Pathogenität-assoziiierter Gene, vorzugsweise in ihrer in vivo-Pathogenität derart abgeschwächt oder gestärkt werden, daß die Bakterien

- a) in definierte Organe des Gesamtorganismus,

- 48 -

b) in bestimmte Gewebe des Wirtsorganismus oder

c) in bestimmte Kompartimente von Zellen

5 vordringen und dort die Fremd-DNA freisetzen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien handelt.

10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien mit den Hinterlegungsnummern DSM 11 881 und DSM 11 882 handelt.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 9 und 10, dadurch  
15 gekennzeichnet, daß in den Bakterien die Gene der im Sequenzprotokoll genannten SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 oder Gene, die mit ihnen mindestens in 35% der Nukleotidpositionen übereinstimmen, genetisch mutiert, deletiert oder blockiert sind.

20 12. Bakterienstamm für das TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, dadurch gekennzeichnet, daß in ihm die im Vektor integrierte und zur späteren Transkription und Expression vorbereitete Fremd-DNA  
25 unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die aus dem zu infizierenden Zielorgan stammen oder auf dieses Zielorgan ausgerichtet sind.

13. Bakterienstamm nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet,  
30 daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem er durch eine Mutation in einem Gen sein Wachstum nicht mehr an die Umweltbedingungen anpassen kann (cspl Mutante DSM 11 883) und/oder durch eine auxotrophe Mutation entsprechend SEQ ID No. 1 und/oder durch eine Mutation im Sinne der endogenen  
35 Attenuation (Stämme DSM 11 881 und 11 882) und/oder durch die

zusätzliche Ausstattung mit einem exogenen Suizidgen genetisch verändert wird.

14. Bakterienstamm nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet,  
5 daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert ist, in dem

a) das cspl-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 2  
oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpo-  
sitionen übereinstimmendes Gen mutiert oder blok-  
10 kiert ist oder

b) das cspl-Gen deletiert ist (Stamm DSM 11883),

c) das dapE-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 1  
15 oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpo-  
sitionen übereinstimmendes Gen deletiert oder  
blockiert ist oder

d) das actA-Gen und/oder das plcB-Gen und/oder das  
20 hly-Gen oder andere an der Virulenz beteiligte Gene  
mutiert, deletiert oder blockiert sind.

15. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß  
es sich bei den manipulierten Bakterien um Salmonellen  
25 handelt, insbesondere um Salmonellen des Stammes mit der  
Hinterlegungsnummer ATCC14028 oder um Abkömmlinge dieses  
Stammes die gemäß dem Anspruch 14 genetisch verändert sind,  
handelt.

30 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Bakterien durch eine Mutation im aroA-Gen, hinterlegt in  
der Genbank Sequenz M 10947, auxotroph sind.

17. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß  
35 es sich bei den genetisch manipulierten Bakterien um apathoge-

- 50 -

ne Listerien, um apathogene oder fakultativ pathogene Enterobacteriaceae oder andere apathogene Bakterien handelt.

18. Verfahren zur Transfektion von animalen Zellen durch  
5 Fremd-DNA, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien als Träger der Fremd-DNA im Cytoplasma

- 10 a) wegen einer auxotrophen Mutation nicht lebensfähig sind;
- b) wegen eines fremden Suizidgens nicht lebensfähig sind;
- 15 c) in die Endosomen der Zellen eindringen, dieses Kompartiment aber nicht verlassen können und dort lysiert werden;
- d) in Phagolysosomen aufgenommen werden, diese Kompartimente lysieren und ins Cytoplasma eindringen;  
20 und
- e) durch Behandlung mit Antibiotika zerstört werden

und dadurch die Fremd-DNA freisetzen.

25

19. Verfahren zur Herstellung eines vorbestimmten Fremd-Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß eine ausgewählte Zelle, ein ausgewähltes Gewebe oder ein Organ gezielt bakteriell infiziert und dort die Bildung des vorbestimmten Proteins  
30 initiiert wird und anschließend das Fremd-Protein aus der Zelle, dem Gewebe oder dem Organ isoliert und gereinigt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von Fremd-Protein im Euter von Milch produzierenden Tieren oder in Eiern von Geflügeltieren oder im Blut  
35

- 51 -

oder anderen Geweben von Nutztieren durch Infektion mit Bakterien induziert wird.

21. Transgenes Nutztier, dadurch gekennzeichnet, daß alle  
5 Zellen seines Organismus oder die Zellen eines oder mehrerer seiner Gewebe oder Organe durch Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 genetisch verändert sind.

22. Verfahren zur Induktion einer somatischen Transgenität  
10 gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das somatisch transgene Gewebe einem Gesamtorganismus reimplantiert und der lebende Gesamtorganismus auf diese Weise somatisch transgen wird.

## SEQUENZPROTOKOLL

## 5 ALLGEMEINE ANGABEN

10 ANMELDER: 1. Privatdozent  
Dr. Christoph von Eichel-Streiber  
Bingerweg 15  
55444 Schweppenhausen  
Bundesrepublik Deutschland  
15 Tel.: 06724/33 98  
Fax : 06724/33 98

2. Prof. Dr. Trinad Chakraborty  
20 Seltersweg 85  
35390 Gießen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: 0641/76 536  
Fax : 0641/99 41 259

25 BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten,  
somatischen Transgenität

30 ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

ZUSTELLANSCHRIFT : Patentanwälte  
35 Dr. Rainer A. Keil  
Ludwig R. Schaafhausen  
Nanno M. Lenz  
Dr. K.-H. Meyer-Dulheuer  
Eysseneckstraße 31  
D-60322 Frankfurt am Main

## COMPUTERLESBARE FASSUNG

DATENTRÄGER : Diskette  
 COMPUTER : IBM PC compatible  
 5 OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 SOFTWARE : Word Perfect 6.0

## Angaben zur Sequenz ID-No 1:

10 Länge : 1260 Basenpaare  
 "Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete  
 Aminosäuresequenzen  
 Strangform : Einzelstrang  
 Topologie : linear  
 15 Herkunft : Listeria monocytogenes Stamm EGD  
 Serotyp 1/2a  
 Merkmal : Sequenz des dapE Gens, das eines der  
 für die Synthese der Diaminopimelin-  
 säure notwendigen Schlüsselenzyme  
 20 ist. Die Aminosäure sequenz ist hoch  
 homolog zu N-succinyl-L-diaminopime-  
 lic acid desuccinylase (dapE) unter  
 anderem aus Escherichia coli, Bacil-  
 lus subtilis, Lactobacillus spp.,  
 25 Mycobacterium tuberculosis.

Aminosäuresequenz: 318 Aminosäuren  
 Nukleotidsequenz : 1260 Nukleotide

30

1 TGCCTTTATA GAGAACGGGA AAACATAGAG TGAATTCAT AGAAAGAGGG  
 51 CGTGAAATAT GGACCAACAA AAAAAGATTC AAATTTTAAA GGA CTGGTA  
 101 AATATTGATT CGACTAATGG GCATGAAGAA CAAGTTGCGA ACTATTTGCA  
 151 AAAGTTGTTA GCTGAACATG GTATTGAGTC CGAAAAGGTA CAATACGACC

3/5



1201 AACTTTAACT TTA CTTATTT CCCGATATAA AATAAGTAAT TAATAGAAGT  
 1251 CTAGTATTTG 1260

5 Angaben zur Sequenz ID-No 2:

Länge : 1337 Basenpaare  
 Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen  
 10 Strangform : Einzelstrang  
 Topologie : linear  
 Herkunft : *Listeria monocytogenes* Stamm EGD 1/2a  
 Merkmal : Sequenz des "cold shock proteins"  
 15 cspL; dieses Protein ist für die Lebensfähigkeit der Listerien bei niedrigen Temperaturen essentiell.

Aminosäuresequenz: 66 Aminosäuren  
 20 Nukleotidsequenz : 1337 Nukleotide

1 GAGGCAAGTG GACTAATCAT AAAGTTTTTG GCGATGCAAC TGCGATTTTG  
 51 GCAGGAGATG CTTTACTAAC GCTCGCTTTT TCTATTTTAG CTGAAGACGA  
 25 101 TAATTTATCT TTTGAGACAC GCATTGCTTT GATTAACCAA ATTAGTTTTA  
 151 GTAGCGGTGC AGAAGGAATG GTTGGTGGTC AACTTGCAGA CTTGGAAGCG  
 201 GAAAACAAAC AAGTGACGCT AGAAGAGTTA TCATCCATTC ATGCACGAAA  
 251 AACGGGTGAA TTATTAATTT ATGCTGTAAC CTCTGCAGCA AAAATTGCGG  
 301 AAGCTGATCC AGAACAAACG AAACGCTTAC GAATTTTTCG AGAGAATATT  
 30 351 GGGATTGGAT TTCAAATTAG CGACGATATT TTAGATGTAA TTGGTGATGA  
 401 AACGAAAATG GGTAAAAAGA CAGGGGCCGA CGCTTTTCTG AATAAAAGTA  
 451 CCTATCCCGG ATTACTCACG CTTGATGGGG CAAAAGGGC ATTAAATGAG  
 501 CATGTTACGA TTGCAAAGTC AGCGCTTTCA GGGCATGATT TCGATGATGA  
 551 AATTCTCTTG AAACCTGCTG ATTTAATCGC ACTTAGAGAA AATTAATCAT  
 35 601 AATTATCTAG TAATTTCAAA ATTTTTCAC ATATATAATT CAAATTGATT  
 651 TGCTTTTCCT AAAATACCGT GTTATACTAA TGTAAGATTA TTTTGTGGG  
 701 TGAAAGATAC GATTGTGAAC AACTTCCAT CTCGTCCGT TAAGCAAGAA

751 TAGTAAATAA TTAGTGTGCA TAACACACGA GGAGGAACAT GAAC ATG GAA  
M E  
801 CAA GGT ACA GTA AAA TGG TTT AAC GCA GAA AAA GGA TTT GGT TTT ATC GA  
Q G T V K W F N A E K G F G F I E  
5 851 A CGC GAA AAC GGT GAC GAT GTA TTC GTA CAT TTC AGC GCT ATC CAA GGC G  
R E N G D D V F V H F S A I Q G  
901 AC GGA TTC AAA TCT TTA GAC GAA GGT CAA GCA GTA ACT TTC GAC GTT GAA  
D G F K S L D E G Q A V T F D V E  
951 GAA GGC CAA CGC GGA CCT CAA GCA GCT AAC GTT CAA AAA GCG TAA TTC TA  
10 E G Q R G P Q A A N V Q K A STOP  
  
1001 TTTTTTGAAT AAGAAAAAGC AAATCATTTT GGTGATTGTC TTTTTTATTT  
1051 GTCTAAAATT ATTTTACCTT GTTTGGTTTA ATGGCGATTG TTGCTATAA  
1101 TAAGAACAAT TAATCGAGAA AAAAGACCTT GCACGCATTG ATGCGAGTGG  
15 1151 CTCTTTGGAA AGTGAGTTGT TTTTATTTGG ATCTTTTAAA GATAAAGGAT  
1201 CCTTCCTTTA TGAAGCGATT GGATATACAA GAATTAGAAG CACTTGCAGC  
1251 GGATATTCGC GCTTTTTTAA TTA CTCTTCTAC ATCTAAATCA GGTGGGCATA  
1301 TTGGTCCGAA TCTTGGTGTG GTAGAACTAA CGATTGC